

## · 动物及环境耐药 ·



**王少林** 副教授，硕士生导师。2009 年在美国奥本大学农学院获得博士学位，专业为分子生物学。目前主要从事药理基因组、毒理基因组、微生物相关宏基因组和生物信息学方面的研究。在 *Nature Genetics*、*Molecular Psychiatry*、*Genome Biology*、*Nucleic Acids Research*、*Molecular Neurobiology*、*Archive Toxicology* 等发表 SCI 论文 54 篇，主要研究成果论文引用 1 400 次以上，第一作者文章共 12 篇，总影响因子超过 60，单篇引用最高 80 次；受邀在国际动植物基因组会议(PAG)上作学术报告 4 次，目前担任 *Frontiers in Addictive Disorder* 和 *Frontiers in Livestock Genomics* 等期刊编委；受邀为 *BMC Genomics*、*PLoS ONE*、*Neuropsychopharmacology*、*Marine Biotechnology* 等期刊审稿；参与出版著作 3 章节，共主持或参与国家自然科学基金 5 项。

# 食品动物养殖环境中细菌耐药性研究进展

史晓敏，王少林

中国农业大学 动物医学院，北京 100193

史晓敏，王少林. 食品动物养殖环境中细菌耐药性研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(8): 1234–1245.

Shi XM, Wang SL. Antibiotic resistance in environment of animal farms. Chin J Biotech, 2018, 34(8): 1234–1245.

**摘要：** 抗生素耐药性被世界卫生组织认为是 21 世纪人类面临的最大的公共卫生安全问题之一。近年来，抗生素耐药基因作为一种新型污染物而受到广泛关注。养殖场现已成为耐药基因的一个重要储库，耐药菌及耐药基因随着动物排泄物进入环境，从而加速了耐药基因在环境中的传播。畜禽养殖环境中耐药基因和耐药菌可能经食物链、空气等途径传至人类，给人类健康带来巨大威胁。文中结合最新文献，主要介绍了动物养殖场抗菌药物耐药菌和耐药基因的分布特点、耐药基因的持留和传播扩散、研究方法等方面的研究进展，为食品动物养殖环境的抗菌药物耐药性风险评估提供一定支持。

**关键词：** 抗生素，耐药菌，耐药基因，养殖环境

**Received:** April 30, 2018; **Accepted:** July 2, 2018

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0501301), National Natural Science Foundation of China (No. 31572568).

**Corresponding author:** Shaolin Wang. Tel: +86-10-62734255; E-mail: shaolinwang@cau.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2016YFD0501301)，国家自然科学基金 (No. 31572568) 资助。

网络出版时间：2018-07-20

网络出版地址：<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180720.1006.002.html>

# Antibiotic resistance in environment of animal farms

Xiaomin Shi, and Shaolin Wang

College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** World Health Organization has recognized antibiotic resistance is one of the serious threats to public health and food-safety in the 21st century. Recently, the antibiotic resistance gene (ARG) has been widely considered as a new pollutant. Now, many studies suggested that animal farm is one of the major reservoirs of ARGs. Antibiotic resistance bacteria and antibiotic resistance genes enter the environment along with animal excrement, accelerating the spread of ARGs in the environment. In the livestock and poultry breeding environment, ARGs and antibiotic resistant bacteria could be transmitted to humans through the food chain, water or air, posing a great threat to public health. This review highlights the prevalence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistant genes in livestock-breeding environment, the retention and spread of ARGs and the method used to study the antibiotic resistance, which will provide certain support for risk assessment of antimicrobial resistance in food animal breeding environment.

**Keywords:** antimicrobial, antibiotic resistance bacteria, antibiotic resistance genes, livestock-breeding environment

作为 20 世纪医学上最重要的发现之一, 抗生素不仅是治疗人类细菌感染最成功的药物, 而且作为预防及治疗用药、促生长剂、饲料添加剂被广泛用于畜牧养殖业, 是保障人类健康和现代养殖业健康发展的有力武器。随着密集型养殖模式的发展, 为保证养殖动物健康, 大量的抗生素用于养殖业, 例如, 仅 2015 年一年我国在养殖业中使用的抗生素高达 9.7 万 t。养殖业中抗菌药物的过度使用甚至是滥用导致抗菌药物耐药性的迅速发展, 近年来, 养殖业尤其是养殖环境中耐药性问题引起了研究者的广泛关注, 大量的研究也表明养殖环境可能在耐药菌、耐药基因的传播扩散中起着非常重要的作用。

文中主要关注养殖场环境及周边环境的耐药性问题, 并将从动物养殖业抗生素耐药现状、耐药基因的持留和传播扩散、研究方法等方面进行综述, 以期让更多人对抗生素耐药性问题有更深入的认识, 为养殖业抗生素耐药性风险评估提供一定的支持。

## 1 动物养殖业抗生素耐药性现状

### 1.1 畜禽养殖业抗生素耐药性现状

抗菌药物在临床和畜禽养殖业的大量使用导

致耐药菌不仅在人群和动物中广泛流行, 而且逐渐向环境中扩散。目前, 畜禽养殖业耐药菌的研究主要涉及动物传染性病原菌及对人畜健康具有重要影响的病原菌, 其中产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (Extend-spectrum- $\beta$ -lactamases, ESBLs) 的细菌、产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌 (Carbapenem-resistance *Enterobacteriaceae*, CRE)、携带多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 的细菌、多重耐药的沙门菌及甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌是目前人们较为关注的耐药菌。

$\beta$ -内酰胺类抗生素是治疗细菌感染的最重要抗生素之一, 尤其是三代和四代头孢菌素, 而 ESBLs 可以水解几乎所有的青霉素类和头孢类抗生素, 且编码 ESBLs 的基因大多在一个较大的质粒上, 该质粒常携带多种抗生素耐药基因, 因此 ESBLs 的菌株多数为多重耐药菌。携带编码 ESBLs 基因的质粒可在不同种属菌株之间水平传播, 加速了编码 ESBLs 基因的传播。产 ESBLs 多重耐药菌的流行不仅对人类健康产生巨大的威胁, 还会增加碳青霉烯类等新型非典型  $\beta$ -内酰胺类抗生素的使用, 从而加剧这类抗生素耐药性的发展。目前, 产 ESBLs 菌不仅是院内感染中常见的多重耐药菌, 而且在动物食品生产链条及环境中

广泛流行。ESBLs 最初在肺炎克雷伯菌中发现, 而目前越来越多的产 ESBLs 大肠杆菌和沙门菌被报道<sup>[1-3]</sup>。目前, 编码 ESBLs 的基因已经超过 600 种变异体, 大部分属于 CTX-M、TEM 和 SHV 型, 其中 CTX-M 阳性菌逐渐成为畜禽养殖业中流行最广泛的产 ESBLs 细菌, 例如 Zheng 等调查的食品动物源 (猪、鸡和牛) 896 株大肠杆菌中 ESBLs 阳性菌为 127 株, 其中 CTX-M 型为 111 株 (87.4%)<sup>[4]</sup>。畜禽养殖场内产 ESBLs 细菌不仅可以通过动物排泄物、空气、苍蝇等进入环境, 对环境造成污染, 还可能通过食物链传播, 给人类健康造成潜在威胁<sup>[5-6]</sup>。

碳青霉烯类抗生素的结构与经典青霉烯结构相似, 不同之处在于 4 位硫原子被碳原子代替及 6 位羟乙基侧链为反式构象, 此特殊结构使得这类抗生素成为非典型  $\beta$ -内酰胺类抗生素<sup>[7]</sup>。该类抗生素具有抗菌谱广、抗菌活性强和毒性低等特点, 是目前治疗严重革兰氏阴性菌感染的最重要抗菌药物之一。因产 ESBLs 菌株和多重耐药革兰氏阴性菌的广泛流行, 碳青霉烯类抗生素的使用量大幅度增加, 导致碳青霉烯类抗生素耐药性日益严重。碳青霉烯酶通过水解碳青霉烯类抗生素介导细菌对该类抗生素耐药, 其中 KPC、VIM、NDM、OXA-23/40/48/58、IMP 等在全球范围内广泛流行而受到广泛关注。一直以来医院是产碳青霉烯酶细菌的重要来源, 院内流行的产碳青霉烯酶菌株主要为肺炎克雷伯菌和大肠杆菌<sup>[8]</sup>。随着监测范围的扩大, 在医院污水、城市污水、动物食品产业链、畜禽养殖环境等均有产碳青霉烯酶细菌的报道。Wang 等对肉鸡产业链中 NDM 和 MCR-1 大肠杆菌分子流行病学的研究表明, 产 NDM 肠杆菌科细菌在除孵化场之外的其他环节样本中均有检出, 对其进行亲缘关系分析, 发现肉鸡产业链各环节来源的部分大肠杆菌亲缘关系相近, 商品鸡场不同来源的大肠杆菌的亲缘关系也相近, 表明碳青霉烯耐药大肠杆菌可能在商品鸡场的不同环境因素之间相互传播<sup>[9]</sup>。

随着碳青霉烯耐药菌的出现和流行, 黏菌素又被重新启用, 该药被认为是治疗产碳青霉烯酶菌引起的多重耐药革兰氏阴性菌感染的“最后一道防线”。由于黏菌素使用量的增加以及作为饲料添加剂的大量使用, 导致其耐药性在最近十几年内迅速发展, 尤其是质粒介导的可移动黏菌素耐药基因 *mcr*, 目前该基因已有 6 种变异体 (*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5*、*mcr-6* 和 *mcr-7*) 被相继报道。7 种 *mcr* 基因中 *mcr-1* 的流行范围最广, 目前在全球 40 多个国家和地区相继发现<sup>[9]</sup>, 大部分国家动物源 *mcr-1* 阳性菌分离率较低 (<5%), 而在中国 (4.9%–30.0%)、日本 (13.2%–28.0%)、越南 (12.5%–37.5%)、南非 (17.6%)、法国 (0.5%–20.5%) 等国家和地区的分率较高<sup>[10]</sup>。值得注意的是, 近年来多黏菌素耐药的产 ESBLs 和 CRE 菌株逐渐增加, 这些多重耐药菌株的出现可能会使人类陷入无药可用的境地。2017 年, Wang 等在肉鸡产业链中分离到 37 株携带 *mcr-1* 基因的 CRE<sup>[9]</sup>; Savov 等在临床上分离获得了 4 株产 KPC-2 型碳青霉烯酶和 SHV-5 型 ESBL 的多黏菌素耐药菌<sup>[11]</sup>; Wu 等在对中国 4 个省市的鸡场耐药性调查中, 分离获得了 44 株携带 *mcr-1* 的 ESBL 阳性大肠杆菌<sup>[12]</sup>。*mcr-1* 基因在环境中的流行状况也不容乐观, 易灵娴等报道称我国动物性食品源 *mcr-1* 阳性大肠杆菌的检出率为 5%–30%, 且表现为逐年增加的趋势<sup>[10]</sup>。Zhang 等在养殖场土壤中分离获得 6 株产 ESBLs 且同时携带 *mcr-1* 基因的大肠杆菌<sup>[13]</sup>。2016 年 6 月, 有研究表明在比利时的仔猪和小牛样本中发现了多黏菌素耐药基因 *mcr-2*<sup>[14]</sup>, 多数研究结果显示该基因的检出率非常低<sup>[15-17]</sup>, 目前, 仅个别研究中该基因的检出率较高, 例如 Zhang 等通过 PCR 方法对猪和家禽 (鸡、鸭、鹅等) 肛拭子和鼻拭子中 *mcr-1/2/3* 进行检测发现 *mcr-2* 的阳性率分别为 56.3% (猪)、5.5% (鸡)、2.3% (鸭)、5.5% (鹅) 和 0% (鸽)<sup>[18]</sup>。

2017 年 4 月, 在中国猪源大肠杆菌样本中发现

了多黏菌素耐药基因 *mcr-3*<sup>[19]</sup>。同年有报道称,在意大利的 2013 年屠宰猪沙门氏菌样本中以及 2015 年和 2016 年西班牙和比利时的猪大肠杆菌样本中发现了多黏菌素耐药基因 *mcr-4*<sup>[20]</sup>。2017 年 8 月,有报道称在德国 2011–2013 年禽类和食品的沙门菌样本中发现了 *mcr-5*<sup>[21]</sup>。由于 *mcr-3/4/5* 基因被报道的时间距今较短,相关数据较少。目前,基因库中已上传了多黏菌素抗性基因 *mcr-6* 和 *mcr-7* 的基因序列,但还未见相关文章和报道。

沙门菌是一种常见的食源性病原菌,多重耐药沙门菌在人群、畜禽养殖业以及屠宰场和肉类加工设施周围的环境中广泛流行,尤其在畜禽养殖业中多重耐药沙门菌的分离率甚至超过 92%<sup>[22]</sup>。目前,多重耐药沙门菌大多对四环素类、喹诺酮类、氯霉素类、青霉素类、单环  $\beta$ -内酰胺类和硝基咪唑表现出耐药<sup>[23]</sup>。此外,来源不同的沙门菌对环丙沙星和头孢噻肟呈不同程度的耐药,例如在 Sinwat 等的研究中,来源于泰国和老挝的猪源(猪养殖场和猪肉)和人源沙门菌大多对环丙沙星、头孢他啶、头孢哌酮、头孢噻肟和头孢泊肟敏感<sup>[22]</sup>; Trongjit 等分离获得的 345 株沙门菌中仅 6 株为产 ESBLs 沙门菌<sup>[24]</sup>,而关于我国六省零售整鸡中环丙沙星与头孢噻肟双耐药的沙门菌流行状况及分子分型的研究中,对环丙沙星与头孢噻肟双耐药的沙门菌共计 227 株 (8.52%, 227/2 629)<sup>[3]</sup>。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一类严重威胁人类健康的“超级细菌”。MRSA 除对甲氧西林耐药之外,对  $\beta$ -内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类、大环内酯类药物等表现出不同程度的耐药。有研究显示,MRSA 在世界范围呈广泛分布,不同国家或地区的分离率存在较大差异,例如德国和荷兰 (>35%)、波兰 (20.6%)、中国 (11.4%)、韩国 (3.2%)、马来西亚 (1.4%)、日本 (0.9%)、中国台湾 (14.4%)<sup>[25]</sup>,动物源性 MRSA 主要在猪场流行,在家禽、牛、羊、马等养殖动物中检出率相对较低。

MRSA 不仅在养殖动物中流行,而且在养殖环境、动物食品生产链条中检出率也较高,例如聂青等研究显示 MRSA 在环境样、猪群、生猪肉和猪肠中的分离率分别为 9.86%、22.68%、44.1% 和 12.5%<sup>[26]</sup>。有研究显示,猪源 MRSA 与人源 MRSA 具有相关性 ( $P=0.001$ ),动物源性 MRSA 在养殖业从业人群中的检出率较高,例如,美国和加拿大养猪农民 MRSA 的检出率分别为 45% 和 20%<sup>[27]</sup>。

随着环境中耐药基因作为新型污染物的概念出现后,荧光定量 PCR 和宏基因组学等非培养的研究方法用于表征各种环境介质中耐药基因的污染水平。荧光定量 PCR 检测方法主要用于表征畜禽养殖过程中常用抗生素的耐药基因的污染状况,如四环素类耐药基因 (*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetE*、*tetH*、*tetM*、*tetK*、*tetL*、*tetO*、*tetQ*、*tetS*、*tetT*、*tetW*、*tetX*、*tetP*)、磺胺类药物耐药基因 (*sul1*、*sul2*、*sul3*)、氟苯尼考耐药基因 (*floR*、*fexA*、*fexB*、*cfr*、*optrA* 等)、喹诺酮类耐药基因 (*qnrD*、*qnrS*、*qepA* 等)、MLS<sub>B</sub> (*ermA*、*ermB*、*ermC*、*ermF*、*ermT*、*ermX*)、 $\beta$ -内酰胺类耐药基因 (TEM 家族、SHV 家族、CTX-M 家族、OXA 家族等) 等<sup>[11]</sup>。大量研究表明<sup>[28-31]</sup>,上述常用抗生素耐药基因在养殖环境中广泛存在,但其污染水平在不同养殖环境中差异较大。例如,Wang 等利用荧光定量 PCR 方法对中国东南地区 5 省的 16 个养殖场中的 5 类抗生素 (四环素类、磺胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类、大环内酯类) 的 21 种耐药基因进行定量调查,发现粪便样品中 *ermB*、*tetM* 和 *sul2* 基因的污染程度最重,其相对丰度达到了  $10^9$  copies/g,阳性率大于 90%。土壤样品中 *tet* 和 *sul* 为优势基因,*sul2* 基因浓度最高达  $1.73 \times 10^9$  copies/g,其次是 *tetC*、*tetM*、*sul1*,浓度高于  $10^8$  copies/g<sup>[30]</sup>。Tao 等检测中国台湾 6 个猪场污水处理系统中耐药基因发现,耐药基因 (*tetA*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*bla*<sub>TEM</sub>) 在所有样品中均被检出,且磺胺类耐药基因平均相对丰度最高 ( $10^{-2}$ – $10^{-1}$ ),其次是 *bla*<sub>TEM</sub> ( $10^{-3}$ – $10^{-2}$ ),

四环素类最低 ( $10^{-4}$ – $10^{-3}$ )<sup>[32]</sup>。Mu 等对中国北方养殖场环境中四环素类、磺胺类及质粒介导的喹诺酮类和大环内酯类等 21 种耐药基因污染水平的研究显示, 21 种耐药基因在大多数样品中均被检测到, 大环内酯类耐药基因 (*ermB*、*ermC*)、磺胺类耐药基因 (*sul1*、*sul2*)、喹诺酮类耐药基因 (*qnrS*、*oqxB*) 和四环素类耐药基因中核糖体保护蛋白基因在所有的样品中均被检测到。畜禽 (猪、鸡、牛) 养殖场环境中污染最严重的是喹诺酮类和磺胺类耐药基因, 大环内酯类耐药基因虽然在所有样品中均被检测到, 但污染水平最低<sup>[31]</sup>。Zhao 等对河南地区猪场环境中氟苯尼考类耐药基因的研究发现, 氟苯尼考类耐药基因整体污染水平较高 ( $10^{-1}$ – $10^{-3}$ ), *fexA*、*optrA* 和 *floR* 在所有样品中均被检测到, *floR* 平均相对丰度最高, 其次是 *optrA*<sup>[33]</sup>。

畜禽养殖场中耐药基因可通过空气、污水、人类活动等对周边土壤、水体和社区造成污染。畜禽粪便或堆肥常作为有机肥用于农业生产, 施肥后, 土壤中耐药基因的多样性及丰度均明显提高, 且土壤的菌群结构也有明显的改变, 同时农产品也会受到耐药菌及耐药基因的污染<sup>[34]</sup>。养殖业尤其是水产养殖过程中会产生大量的污水, 而目前的污水处理技术不能有效地消除污水中残留的抗生素及抗生素耐药基因<sup>[35]</sup>。目前, 养殖业产生的污水多排入周边水体或用于灌溉, 收纳水体及土壤中均能检测到残留的抗生素及耐药基因<sup>[36]</sup>。Ma 等和 Li 等通过宏基因组学对不同来源样品中耐药基因分析结果显示耐药基因及耐药基因的可移动遗传元件在人、不同动物及环境间发生水平传播<sup>[37-38]</sup>。

## 1.2 水产养殖业抗生素耐药性现状

水产养殖同样被认为是水环境抗生素耐药基因和耐药菌的重要储库。磺胺类药物、青霉素类、四环素类、氟苯尼考类及喹诺酮类抗生素是水产养殖业防治细菌感染常用的几类抗生素。目前, 水产养殖业耐药性的研究主要集中在气单胞菌属、沙门菌属、埃希氏菌属、克雷伯氏菌属等。

水产养殖分离获得的气单胞菌多数对杆菌肽、氨苄青霉素、青霉素耐药, 而对卡那霉素、氟甲喹和恩诺沙星耐药的较少。不同研究中四环素、红霉素、链霉素、庆大霉素、恶喹酸等抗生素的气单胞菌耐药菌株分离率差异较大, 例如不同研究中红霉素耐药气单胞菌的分离率分别为 60%<sup>[39]</sup>、95% 以上<sup>[40]</sup>、54.5%<sup>[41]</sup>; 四环素耐药气单胞菌分离率分别为 0%<sup>[39]</sup>、20%<sup>[42]</sup>、48%<sup>[43]</sup>、51.4%<sup>[40]</sup>等。随着抗生素的大量使用, 多重耐药气单胞菌的流行日益严重, 在某些研究中多重耐药气单胞菌的分离率甚至达到 100%<sup>[44]</sup>。近年来, 气单胞属对  $\beta$ -内酰胺类的耐药性呈上升趋势, 在 Radu 等的研究中 99.2% 的气单胞菌株对一种或多种  $\beta$ -内酰胺类 (头孢噻唑、氨苄西林-克拉维酸、氨苄西林、哌拉西林、头孢泊肟) 表现出耐药性, 25.2% 菌株对上述所有的  $\beta$ -内酰胺类抗生素均耐药<sup>[44]</sup>。Yin 等发现气单胞菌还可能是多黏菌素耐药基因 *mcr-3* 的潜在储库<sup>[19]</sup>。

水产养殖的肠杆菌科细菌对四环素类、氨苄西林和磺胺类药物表现出较高的耐药率, 在多数研究中超过 50% 的大肠杆菌对氨苄青霉素表现为耐药, 而对喹诺酮类及大环内酯类表现为较低的耐药率。近年来, 人们对于多重耐药的肠杆菌科细菌越来越关注, 水产养殖业也是多重耐药肠杆菌科细菌的重要来源, 在 Agoba 等的研究中, 90% 的分离株对 3 种或 3 种以上的常用抗生素表现出耐药<sup>[45]</sup>。目前, 产 ESBLs 肠杆菌科细菌在水产养殖业中的报道较少, 且在不同研究中产 ESBLs 的肠杆菌科细菌的分离率差异较大, Almeida 等从零售的新鲜鱼虾样品中仅分离到 2 株产 ESBLs 大肠杆菌<sup>[46]</sup>, 而 Brahmi 等对地中海阿尔及利亚海岸野生鱼携带产 ESBLs 细菌的调查中, 从 300 份样品中分离获得 64 株产 ESBLs 肠杆菌科细菌, 其中产 CTX-M 型  $\beta$ -内酰胺酶的肠杆菌科细菌比例最高<sup>[47]</sup>。

水产养殖业也是多重耐药沙门菌的重要来源之一。大量研究表明水产来源的沙门菌对头孢类、

氯霉素类、四环素、利福平、林可霉素类、氨基糖苷类、磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类、硝基咪唑类等多种抗生素表现出不同程度耐药性,同时在某些研究中也检测到有不同比例的多重耐药沙门菌<sup>[48-53]</sup>。

基于非培养技术,关于水产养殖环境耐药基因分布特征的研究也越来越全面。在水产养殖环境中,磺胺类药物、四环素类、大环内酯类和 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药基因的检出率较高<sup>[54-58]</sup>,多数研究表明磺胺类药物和四环素类耐药基因的相对丰度高于其他抗生素耐药基因<sup>[54,56-57]</sup>,且一种抗生素不同机制的耐药基因在养殖环境中均能检出<sup>[54-57]</sup>。在对不同水产养殖模式下养殖环境中耐药基因的研究中,发现混养模式例如鸭-鱼模式的养殖环境中耐药基因的多样性明显高于单一养殖模式<sup>[57]</sup>。Huang等和 Muziasari 等的研究表明养殖环境中的耐药基因主要来源于养殖动物的粪便<sup>[57-58]</sup>。

## 2 耐药基因持留及传播扩散的相关因素

畜禽养殖环境中耐药基因呈高丰度、多样性分布,而出现这种结果是多方面因素共同作用产生的,目前的研究主要集中在养殖环境中抗菌药物的残留、重金属的污染、可移动遗传元件 3 个相关因素。

### 2.1 抗菌药物残留

抗菌药物作为治疗、预防用药和抗菌促生长剂而大量应用于畜禽养殖业。抗菌药物随着畜禽排泄物进入环境,成为环境中重要的污染物。残留在环境中的抗菌药物会对环境微生物产生选择压力,促进环境中细菌耐药性的发展<sup>[59]</sup>。Ji 等针对上海地区养殖场堆肥及养殖场周边农田土壤样品中耐药基因丰度与抗菌药物含量之间的相关性研究显示耐药基因 *sulI* 与磺胺嘧啶含量呈较强的正相关关系 ( $r=0.847$ )<sup>[60]</sup>。Zhao 等对施用过鸡堆肥的农田土壤样品中耐药基因和耐药细菌的研究,同样发现磺胺类耐药基因与磺胺醋酰的残留

量间存在非常强的正相关关系 ( $R^2=0.9525$ )<sup>[61]</sup>。Wu 等对中国典型猪养殖场周边土壤中四环素类耐药基因分布特征的研究,显示四环素类耐药基因 *tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetW* 的总含量与四环素残留量间存在一定的正相关关系 ( $R^2=0.45$ )<sup>[30]</sup>。Tang 等和 Zhao 等在畜禽养殖环境中耐药基因和抗生素残留量的相关性研究中也获得了相似结果<sup>[33,62]</sup>。然而,目前也有研究显示,环境中耐药基因丰度与抗菌药物残留量间不存在明显的相关性<sup>[63-64]</sup>,这种现象可能是由于环境样品的特殊性质或进入环境后不同耐药基因和抗菌药物的传播机制不同造成的<sup>[63]</sup>。

### 2.2 可移动遗传元件

可移动遗传元件包括质粒、转座子、插入序列、整合子等可以在同种甚至不同种细菌间传播,从而介导耐药基因在基因水平上的快速传播。携带耐药基因质粒可携带一种或多种耐药基因,可通过接合、转化等方式传播耐药基因,如 Wang 等对同时携带 *bla<sub>NDM</sub>* 和 *mcr-1* 基因的大肠杆菌的转移性研究中发现,*bla<sub>NDM</sub>* 和 *mcr-1* 既能单独又可同时发生转移<sup>[9]</sup>。Ma 等认为 *intI1* (I 型整合子) 是环境中耐药基因污染的重要指征。*intI1* 不仅可以携带耐药基因还可介导耐药基因的水平转移<sup>[65]</sup>。例如, Hsu 等在对猪养殖场及周围环境中磺胺类药物的耐药基因及耐药菌的研究中发现磺胺类药物耐药基因的传播扩散可能与 *intI1* 相关<sup>[64]</sup>。Zhou 等发现牛养殖场环境中耐药基因丰度与可移动遗传元件的丰度呈正相关关系,表明牛养殖环境中耐药基因的广泛流行可能与可移动遗传元件有关<sup>[66]</sup>。

### 2.3 金属的污染

铜、锌等微量元素是动物饲料的成分之一,是动物生长所必需的。同时铜、锌等因其具有促生长和缓解断奶仔猪痢疾的作用而被广泛应用。这些金属离子随着粪便进入环境,对环境细菌耐药性的产生和发展具有重要影响。Knapp 等发现土壤中耐药基因的丰度与铜、锌、镍、铁、铬等金属含量呈正相关,并且 *tet (M)* 的丰度与金属污

染程度的相关性最强,金属铜与土壤中耐药基因丰度相关性最强<sup>[63]</sup>。Zhou 等和 Song 等研究证明养殖场环境中耐药基因的维持和传播与铜和锌的含量密切相关<sup>[66-67]</sup>。Song 等研究证明在某些情况下,金属离子对于某些抗生素耐药性的选择压力可能超过抗生素<sup>[67]</sup>。

在过去几十年中关于耐药基因和金属抗性基因共存的现象被不断报道,例如甲氧西林耐药基因与 Zn 抗性基因,四环素耐药基因与 Cu 抗性基因,多种耐药基因与 Hg 抗性基因等<sup>[68-70]</sup>。在抗生素和金属负荷高的地区(例如畜禽及水产养殖环境),这种共选择现象尤为常见<sup>[71-72]</sup>。目前已发现多种与金属抗性基因相关的耐药基因,其中 $\beta$ -内酰胺、卡那霉素、杆菌肽、氨基糖苷类、多黏菌素和四环素类耐药基因被认为是最有可能与金属抗性基因共存的6种<sup>[73]</sup>。环境中金属污染对细菌产生的选择压力,使金属抗性基因和耐药基因同时被富集。目前的研究还显示,耐药基因和金属抗性基因除了共存以外还存在共传播的现象,例如耐药基因与金属抗性基因常位于一个整合子或质粒上<sup>[74]</sup>。同时与单一基因转移相比,耐药基因与金属抗性基因共转移的电位理论上可以增加细菌的适应性,从而加速耐药基因和金属抗性基因的扩散<sup>[73]</sup>。

### 3 研究方法

#### 3.1 细菌分离培养技术

基于传统的细菌分离培养技术的耐药基因分子机制研究是目前细菌耐药性研究中最常见的研究方法。首先,样品通过培养基分离纯化,获得环境样本中的耐药菌株;PCR 技术对菌种的基因型和菌属进行测定;脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点序列分型(MLST)等技术对其进行菌种分型分析。分子分型对于确定细菌耐药性的产生源头、传播途径、传播方式等具有重要意义。重要的基因型或特殊表型的菌种,可进一步对基因的耐药机制和传播机制展开研究。目前,基于细菌

分离培养法的细菌耐药性研究方法已经非常成熟,在新型耐药基因的发现及耐药基因的传播扩散规律研究中发挥着重要的作用,如在耐药基因 *bla*<sub>NDM</sub>、质粒介导的多黏菌素耐药基因 *mcr-1*、*mcr-3* 的发现及 *mcr-1* 和 *bla*<sub>NDM</sub> 通过食物链传播的研究中发挥着不可替代的作用<sup>[9,19,75]</sup>。但是,此方法操作步骤复杂,且对环境中抗菌药物耐药菌的筛选具有很大的局限性。研究表明,目前环境中99%的微生物无法通过培养得到,因此可培养的方法不能全面地研究环境中耐药基因的流行状况。

#### 3.2 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 是一种利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每个循环扩增产物量的变化,最终精确定量模板起始量的方法,包括 SYBR Green 染料法和 TaqMan 探针法。实时荧光定量 PCR 方法可对样品总 DNA 进行定量检测目的基因的拷贝数,从而明确环境中耐药基因的污染水平。荧光定量 PCR 现已成为环境耐药性监测的重要研究手段。耐药基因在畜禽养殖场内及周边环境、施肥的农田、污水处理系统、河流、地表水、养殖场地下水等环境中的分布特征和污染程度相继被表征出来<sup>[30,32,64,76-77]</sup>。这些研究阐明了畜牧水产养殖环境、周边环境及接纳环境中耐药基因的分布特征,污水处理对于耐药基因的消除效果,医院及抗菌药物生产企业废水中耐药性、自然环境如河流、地表水中耐药基因的分布特征和污染水平,进一步揭示了人类活动对于环境细菌耐药性的影响。同时荧光定量 PCR 可与其他检测方法相结合,对于耐药基因在环境中传播规律的研究中表现出更大的优势。Popowska 等通过荧光定量 PCR 与常规培养法相结合对土壤中四环素类、氨基糖苷类和大环内酯类耐药基因的分布特征进行了全面研究,显示四环素耐药基因分布广泛且污染程度高,施过肥的土壤样品中耐药基因污染程度高于未施肥的,且分离自前者的耐药菌 MIC 值高于后者<sup>[78]</sup>。荧光定量 PCR 与 16S rRNA



测序技术相结合从宏观视角对环境中耐药基因及微生物群落特征进行全面研究。Zhu 等通过荧光定量 PCR 方法与抗生素、金属离子定量分析方法结合,探究了猪场环境样品中抗生素耐药基因与抗生素残留及金属离子含量的相关性<sup>[72]</sup>。

### 3.3 宏基因组学研究

宏基因组学研究是针对样品中微生物总 DNA 的分析。通过构建功能宏基因组文库或宏基因组测序文库,对样品中微生物的群落结构、特定功能的基因、未知基因等进行研究<sup>[79]</sup>。Zhao 等通过构建土壤宏基因组测序文库发现河南省的 5 个猪场土壤中氟苯尼考耐药基因呈不同程度的污染。同时,通过构建土壤功能宏基因组文库,筛选到对氟苯尼考耐药的克隆,并发现阳性克隆中可能存在某种新型耐药基因<sup>[33]</sup>。Zhang 等通过序列宏基因组文库,对各种水环境中耐药基因种类、丰度和可能的传播途径进行研究<sup>[80]</sup>。序列宏基因组不仅在环境细菌耐药性研究领域发挥着重要作用,而且在公共卫生安全领域的研究中也起着关键作用。Ma 等对猪、鸡、人的粪便和污水处理厂废水中耐药基因的分布特征研究发现四环素类、大环内酯类、氨基糖苷类耐药基因和大环内酯类-林可霉素类-链阳菌素耐药基因在粪便样品中含量较高;猪、鸡、人的粪便样品和废水样品中存在多种相同耐药基因,如四环素耐药基因 *tetA-tetR* 以同样的排列方式存在于不同的样品中<sup>[65]</sup>。Forsberg 通过宏基因组学方法对土壤菌群及临床菌株中携带耐药基因的情况进行研究,发现土壤样品中多重耐药菌和临床耐药菌株携带的耐药基因岛具有高度一致性<sup>[81]</sup>。上述研究结果表明耐药基因可能会在人、动物和生态环境之间相互传播,给公共卫生安全造成巨大的威胁。Oppegaard 等<sup>[82]</sup>、Hsu 等<sup>[64]</sup>、Li 等<sup>[38]</sup>的研究进一步揭示了耐药基因在人-动物-生态环境之间的水平传播的相关因素<sup>[38,64,82]</sup>。

### 3.4 单分子测序技术

纳米孔测序技术最初由 David Deamer、

George Church 和 Daniel Branton 三位科学家提出,随着测序技术的发展,现在已成为一种具有强竞争力的便携式测序技术<sup>[83]</sup>。该技术主要利用单分子 DNA 链穿过纳米级的小孔时,不同碱基引起电流发生不同的变化,并将电信号转换为碱基序列来实现测序。该测序技术具有超长读长、实时测序、耗时短、可直接针对 DNA 和 RNA 进行测序、成本相对较低等特点<sup>[84]</sup>。然而该测序技术的测序准确度相对较低,且对于测序的基因组、电脑配置和测序芯片质量要求高,从而一定程度上限制了该技术的推广<sup>[84]</sup>。目前英国 Oxford Technology 公司推出了新型便携式测序仪 MinION,通过 MinION 可以实现实时实地对样品中基因组进行快速检测,减少运输、储存等过程中造成的数据失真。目前,在耐药性研究领域已有采用该技术的相关研究,例如 Xia 等通过该技术对城市污水中大肠杆菌菌群耐药表型和基因型的相关性进行了研究<sup>[85]</sup>;Ludden 等使用纳米孔测序技术和二代测序技术证明了污水中携带碳青霉烯酶基因质粒可能在不同细菌之间交换,为环境中耐药基因传播机制的研究提供了一种新的研究方法<sup>[86]</sup>。

## 4 总结

畜禽养殖场环境是耐药基因的重要储库,耐药基因通过污水和堆肥处理不能被有效消除,且能随着人类活动对周围环境造成污染,从而使环境成为耐药基因或耐药菌传播的重要介质和储库,给人类健康和公共卫生安全带来巨大威胁。除畜禽养殖常用抗菌药物的各类耐药基因外,临床上重要的抗生素耐药基因如碳青霉烯类耐药基因也可从环境中分离获得。目前研究从统计学层面分析得到畜禽养殖环境高水平的耐药基因污染现状是多方面因素共同作用的结果,但是对其形成机制研究较少。

## REFERENCES

- [1] Sreekanth B, Dattaraya G. Detection of extended



- spectrum beta-lactamases (ESBLs) producers in clinical isolates. *Int J Med Sci Public Health*, 2014, 3(9): 1132–1134.
- [2] Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(S4): 1–16.
- [3] Hu Y, He Y, Wang Y, et al. Epidemic condition and molecular subtyping of ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella Indiana* isolated from retail chicken carcasses in six provinces, China. *Chin J Prev Med*, 2015, 49(8): 716–721.
- [4] Zheng HQ, Zeng ZL, Chen S, et al. Prevalence and characterisation of CTX-M  $\beta$ -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39(4): 305–310.
- [5] Blaak H, van Hoek AHAM, Hamidjaja RA, et al. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment L. S. van Overbeek. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0135402.
- [6] Sun J, Huang T, Chen C, et al. Comparison of fecal microbial composition and antibiotic resistance genes from swine, farm workers and the surrounding villagers. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4965.
- [7] Xu H, Xu YL, Ma HM. Research progress in carbapenems antibiotics. *J Shenyang Pharm Univ*, 2007, 24(6): 385–388 (in Chinese).  
徐辉, 徐玉兰, 马红梅. 碳青霉烯类抗生药的研究进展. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(6): 385–388.
- [8] Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist*, 2012, 5: 133–141.
- [9] Wang Y, Zhang RM, Li JY, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 16260.
- [10] Yi LX, Liu YY, Wu RJ, et al. Research progress on the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1*. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(2): 110–126 (in Chinese).  
易灵娴, 刘艺云, 吴仁杰, 等. 质粒介导的黏菌素耐药基因 *mcr-1* 研究进展. *遗传*, 2017, 39(2): 110–126.
- [11] Savov E, Todorova I, Politi L, et al. Colistin resistance in KPC-2- and SHV-5-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in *Bulgaria*. *Chemotherapy*, 2017, 62(6): 339–342.
- [12] Wu C, Wang Y, Shi X, et al. Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008–2014. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1).
- [13] Zheng BW, Huang C, Xu H, et al. Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing, MCR-1-harboring *Escherichia coli* in farming soil. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2510.
- [14] Xavier BB, Lammens C, Ruhul R, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*, 2016, 21(27), doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.
- [15] Simmen S, Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, et al. Investigation for the colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-2* in clinical *Enterobacteriaceae* isolates from cats and dogs in Switzerland. *Am J Anim Vet Sci*, 2016, 2(4): 26–29.
- [16] Mavrici D, Yambao JC, Lee BG, et al. Screening for the presence of *mcr-1/mcr-2* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from a major produce-production region in California. *PLoS ONE*, 2017, 12(11): e0187827.
- [17] Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, et al. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014–2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS ONE*, 2018, 13(4): e0195281.
- [18] Zhang JL, Chen L, Wang JW, et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/rectal swabs from pigs and poultry. *Sci Rep*, 2018, 8: 3705.
- [19] Yin WJ, Li H, Shen YB, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, 2017, 8(3): e00543–17.
- [20] Li JY, Hulth A, Nilsson LE, et al. Occurrence of the mobile colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli* from household pigs in rural areas. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(6): 1721–1723.
- [21] Carattoli A, Villa L, Feudi C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill*, 2017, 22(31): 30589.
- [22] Sinwat N, Angkittitrakul S, Coulson KF, et al. High prevalence and molecular characteristics of multidrug-resistant *Salmonella* in pigs, pork and humans in

- Thailand and Laos provinces. *J Med Microbiol*, 2016, 65(10): 1182–1193.
- [23] Gong J, Kelly P, Wang C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* Serovar *Indiana* in China (1984–2016). *Zoon Public Health*, 2017, 64(4): 239–251.
- [24] Trongjit S, Angkititrakul S, Tuttle RE, et al. Prevalence and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from broiler chickens, pigs and meat products in Thailand-Cambodia border provinces. *Microbiol Immunol*, 2017, 61(1): 23–33.
- [25] Jayaweera JAAS, Kumbukgolla WW. Antibiotic resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from livestock and associated farmers in Anuradhapura, Sri Lanka. *Germes*, 2017, 7(3): 132–139.
- [26] Nie Q, Shi L, Zhou CQ, et al. Prevalence and drug resistant of *Staphylococcus aureus* from swine farm and processing chain. *Mod Food Sci Technol*, 2016, 32(2): 289–295 (in Chinese).  
聂青, 石磊, 周臣清, 等. 生猪养殖场环境及屠宰加工环节金黄色葡萄球菌污染及耐药谱状况. *现代食品科技*, 2016, 32(2): 289–295.
- [27] Pang L, Xu J, Lin L, et al. Research progress of livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Chin Pharmaceut Affairs*, 2012, 26(11): 1249–1254 (in Chinese).  
庞璐, 徐进, 林兰, 等. 动物源性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌的研究进展. *中国药事*, 2012, 26(11): 1249–1254.
- [28] Qian X, Gu J, Sun W, et al. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. *J Hazard Mater*, 2017, 344: 716–722.
- [29] Chen B, Hao LJ, Guo XY, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes of wastewater and surface water in livestock farms of Jiangsu Province, China. *Environ Sci Pollut Res*, 2015, 22(18): 13950–13959.
- [30] Wu N, Qiao M, Zhang B, et al. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(18): 6933–6939.
- [31] Mu QH, Li J, Sun YX, et al. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China. *Environ Sci Pollut Res*, 2014, 22(9): 6932–6940.
- [32] Tao CW, Hsu BM, Ji WT, et al. Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *Sci Total Environ*, 2014, 496: 116–121.
- [33] Zhao Q, Wang Y, Wang S, et al. Prevalence and abundance of florfenicol and linezolid resistance genes in soils adjacent to swine feedlots. *Sci Rep*, 2016, 6: 32192.
- [34] Zhang YJ, Hu HW, Gou M, et al. Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics. *Environ Pollut*, 2017, 231(Pt 2): 1621–1632.
- [35] Tehrani AH, Gilbride KA. A closer look at the antibiotic-resistant bacterial community found in urban wastewater treatment systems. *Microbiology Open*, 2018(2): e00589.
- [36] Zheng NG, Huang N, Wang WW, et al. Effects of thermophilic composting on antibiotic resistance genes (ARGs) of swine manure source. *Environ Sci*, 2016, 37(5): 1986–1992.
- [37] Ma LP, Xia Y, Li B, et al. Metagenomic assembly reveals hosts of antibiotic resistance genes and the shared resistome in pig, chicken, and human feces. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(1): 420–427.
- [38] Li B, Yang Y, Ma LP, et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J*, 2015, 9(11): 2490–2502.
- [39] Joshi H. Isolation, identification, and antibiotics resistance of *Aeromonas* spp. from lakes of Udaipur (Rajasthan), India. *Asian J Pharm*, 2018, 10(5): 1–5.
- [40] Vivekanandhan G, Savithamani K, Hatha AAM, et al. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *Int J Food Microbiol*, 2002, 76(1/2): 165–168.
- [41] Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, et al. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol*, 2003, 84(1): 41–49.
- [42] Ndi OL, Barton MD. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J Fish Dis*,

- 2011, 34(8): 589–599.
- [43] Son R, Rusul G, Sahilah AM, et al. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*). *Lett Appl Microbiol*, 1997, 24(6): 479–482.
- [44] Radu S, Ahmad N, Ling FH, et al. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *Int J Food Microbiol*, 2003, 81(3): 261–266.
- [45] Agoba EE, Adu F, Agyare C, et al. Antibiotic resistance patterns of bacterial isolates from hatcheries and selected fish farms in the Ashanti region of Ghana. *J Microbiol Antimicrob*, 2017, 9(4): 35–46.
- [46] De Almeida MVA, Cangussú ÍM, De Carvalho LS, et al. Drug resistance, AmpC- $\beta$ -lactamase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae isolated from fish and shrimp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2017, 59: e70.
- [47] Brahmi S, Touati A, Dunyach-Remy C, et al. High prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae in wild fish from the Mediterranean sea in Algeria. *Microb Drug Resist*, 2017, 24(3): 290–298.
- [48] Elhadi N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2013, 4(3): 234–238.
- [49] Zhang JM, Yang XW, Kuang D, et al. Prevalence of antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serovars in retail aquaculture products. *Int J Food Microbiol*, 2015, 210: 47–52.
- [50] Costa RA, de Carvalho FCT, dos Fernandes Vieira RHS. Antibiotic resistance in *Salmonella*: a risk for tropical aquaculture. *Salmonella-A Diversified Superbug*. InTech, 2012.
- [51] Broughton EI, Walker DG. Prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* in fish in Guangdong, China. *Foodborne Pathog Dis*, 2009, 6(4): 519–521.
- [52] Budiati T, Rusul G, Wan-Abdullah WN, et al. Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia. *Aquaculture*, 2013, 372–375: 127–132.
- [53] Carvalho FCT, Sousa OV, Carvalho EMR, et al. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated from shrimp farming freshwater environment in northeast region of Brazil. *J Pathog*, 2013, 2013: 685193.
- [54] Chen BW, Lin L, Fang L, et al. Complex pollution of antibiotic resistance genes due to *beta*-lactam and aminoglycoside use in aquaculture farming. *Water Res*, 2018, 134: 200–208.
- [55] Liang XM, Nie XP, Shi Z. Preliminary studies on the occurrence of antibiotic resistance genes in typical aquaculture area of the Pearl River Estuary. *Environ Sci*, 2013, 34(10): 4073–4080.
- [56] Xiong WG, Sun YX, Zhang T, et al. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microb Ecol*, 2015, 70(2): 425–432.
- [57] Huang L, Xu YB, Xu JX, et al. Antibiotic resistance genes (ARGs) in duck and fish production ponds with integrated or non-integrated mode. *Chemosphere*, 2017, 168: 1107–1114.
- [58] Muziasari WI, Pitkänen LK, Sørum H, et al. The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below baltic sea fish farms. *Front Microbiol*, 2017, 7: 2137.
- [59] Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut*, 2009, 157(11): 2893–2902.
- [60] Ji XL, Shen QH, Liu F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China. *J Hazard Mater*, 2012, 235–236: 178–185.
- [61] Zhao X, Wang JH, Zhu LS, et al. Environmental analysis of typical antibiotic-resistant bacteria and ARGs in farmland soil chronically fertilized with chicken manure. *Sci Total Environ*, 2017, 593–594: 10–17.
- [62] Tang XJ, Lou CL, Wang SX, et al. Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: evidence from four field experiments in south of China. *Soil Biol Biochem*, 2015, 90: 179–187.
- [63] Knapp CW, McCluskey SM, Singh BK, et al. Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS ONE*, 2011, 6(11): e27300.
- [64] Hsu JT, Chen CY, Young CW, et al. Prevalence of sulfonamide-resistant bacteria, resistance genes and integron-associated horizontal gene transfer in natural

- water bodies and soils adjacent to a swine feedlot in northern Taiwan. *J Hazard Mater*, 2014, 277: 34–43.
- [65] Ma LP, Li B, Zhang T. Abundant rifampin resistance genes and significant correlations of antibiotic resistance genes and plasmids in various environments revealed by metagenomic analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(11): 5195–5204.
- [66] Zhou BR, Wang C, Zhao Q, et al. Prevalence and dissemination of antibiotic resistance genes and coselection of heavy metals in Chinese dairy farms. *J Hazard Mater*, 2016, 320: 10–17.
- [67] Song JX, Rensing C, Holm PE, et al. Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(5): 3040–3047.
- [68] Wales AD, Davies RH. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 2015, 4(4): 567–604.
- [69] Di Cesare A, Eckert EM, D'urso S, et al. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Res*, 2016, 94: 208–214.
- [70] Johnson TA, Stedtfeld RD, Wang Q, et al. Clusters of antibiotic resistance genes enriched together stay together in swine agriculture. *mBio*, 2016, 7(2): e02214–15.
- [71] Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol*, 2012, 3: 399.
- [72] Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(9): 3435–3440.
- [73] Li LG, Xia Y, Zhang T. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *ISME J*, 2017, 11(3): 651–662.
- [74] Zhang T, Zhang XX, Ye L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e26041.
- [75] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 161–168.
- [76] Chen QL, An XL, Li H, et al. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environ Int*, 2016, 92–93: 1–10.
- [77] Cheng WX, Chen H, Su C, et al. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China. *Environ Int*, 2013, 61: 1–7.
- [78] Popowska M, Rzczycka M, Miernik A, et al. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(3): 1434–1443.
- [79] Port JA, Wallace JC, Griffith WC, et al. Metagenomic profiling of microbial composition and antibiotic resistance determinants in Puget Sound. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e48000.
- [80] Zhang XX, Zhang T, Fang HHP. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(3): 397–414.
- [81] Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 2012, 337(6098): 1107–1111.
- [82] Oppegaard H, Steinum TM, Wasteson Y. Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3732–3734.
- [83] Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, et al. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(24): 13770–13773.
- [84] Laver T, Harrison J, O'Neill PA, et al. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomol Detect Quantificat*, 2015, 3: 1–8.
- [85] Xia Y, Li AD, Deng Y, et al. MinION nanopore sequencing enables correlation between resistome phenotype and genotype of coliform bacteria in municipal sewage. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2105.
- [86] Ludden C, Reuter S, Judge K, et al. Sharing of carbapenemase-encoding plasmids between *Enterobacteriaceae* in UK sewage uncovered by MinION sequencing. *Microb Genom*, 2017, 3(7): e000114.

(本文责编 陈宏宇)